

**Zytomegalievirus-Infektion der Maus
unter Vidarabin-Behandlung**

Werner Rist

1981

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. K. Betke

ZYTOMEGALIEVIRUS-INFEKTION DER MAUS

UNTER VIDARABIN-BEHANDLUNG

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

WERNER RIST

aus

Sonthofen

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Peller

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Betke

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 10. 1981



Herrn Prof. Dr. med. Peter Peller möchte ich besonders für die Überlassung des interessanten Themas danken sowie für seine fachliche Beratung während meiner Arbeit im Viruslabor.

Mein Dank gilt auch Frau Hedwig Nickel und Frau Heidi Gramm, die mich mit den technischen Grundlagen der Virologie als Voraussetzung für diese Arbeit vertraut machten.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A E i n l e i t u n g	1
I. Nucleosid-Analoga: Problematische virostatistische Therapie	2
II. Vidarabin - ein potentes Virostatikum mit geringer Toxizität	3
1. Chemie	3
2. Antivirale Mechanismen	3
3. Pharmakologie und Metabolismus	4
4. Toxizität	6
5. Virostatistische Studien	8
III. Ziel der vorliegenden Arbeit	11
B E x p e r i m e n t e l l e r T e i l	13
I. Material und Methodik	13
II. Versuchsaufbau	17
III. Ergebnisse eigener Untersuchungen	
1. Wirkung von Vidarabin auf die humorale Immunität der Maus	19
2. Wirkung von Vidarabin auf die Mäuse- zytomegalievirus-Infektion der Maus	
a) Allgemeinverhalten	22
b) Pathologische Befunde und Histologie	23
c) Letalität	26
d) Virusgehalt der Leber	31
C D i s k u s s i o n	33
D Z u s a m m e n f a s s u n g	38
E S c h l u ß f o l g e r u n g	39
F L i t e r a t u r	40

Einleitung

Die Zytomegalie ist eine sehr häufig und ubiquitär vorkommende Infektion mit dem Zytomegalievirus (CMV), einem DNS-Virus aus der Herpes-Subgruppe B.

Die klinischen Ausprägungen der Zytomegalie sind sehr verschieden. 10 % aller konnatal mit dem Zytomegalievirus infizierten Neugeborenen haben die klinischen Zeichen einer konnatalen Zytomegalie (8). Sie verläuft meistens in generalisierter Form und ist gekennzeichnet durch Hepatosplenomegalie, Ikterus gravis, einer Thrombozytopenie, einer Anämie mit Erythroblastämie und Retikulozytose, sowie einer Neutropenie. In hohem Prozentsatz wird auch das Gehirn mitbefallen, wobei es zu Hirnblutungen, Krämpfen, Mikrozephalie sowie intrakraniellen Verkalkungen kommt. Jenseits der Neugeborenenperiode werden die klinischen Hinweissymptome weniger charakteristisch. Neben lokalen Parotisinfectionen werden zerebrale, hepatomegale, gastrointestinale und pulmonale Verlaufsformen unterschieden (81). Auch klinische Mononukleosen mit negativem Paul-Bunell-Test konnten in letzter Zeit vermehrt auf CMV-Infektionen zurückgeführt werden (16).

Der Verlauf und die Prognose einer Zytomegalieinfektion hängen wesentlich vom Lebensalter und der Verlaufsform ab. Normalerweise tritt sie inapparent auf oder führt zu leichten klinischen Ausprägungen. Unter besonderen Bedingungen jedoch, wie zum Beispiel bei Bluttransfusionen, nach Organtransplantationen, im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen und vor allem nach immunsuppressiver Therapie (47, 88) kann es zu schweren lokalen oder generalisierten Erkrankungen kommen, die zu bleibenden Schäden und zum Teil zum Tod führen können.

I. Nucleosid-Analoga: Problematische virostatistische Therapie

Diese potentiellen Gefährdungen der Zytomegalie und die neurologisch-psychischen Komplikationen der kongenitalen Zytomegalie gaben Anlaß, verschiedene antivirale Chemotherapeutika gegen die Zytomegalie zu testen, wie zum Beispiel Idoxuridin (IDU) (27), Floxuridin (32), und Cytosin Arabinosid (Ara-C) (91).

Diese antiviralen Stoffe haben sich aber bisher als wenig wirksam erwiesen. Zudem wurden die Erwartungen in eine systematische Anwendung von IDU und anderer Purinnucleoside gedämpft durch die Toxizität dieser Stoffe bei parenteraler Anwendung. Die gravierenden Nebenwirkungen bestanden vor allem in einer Unterdrückung der Funktion des Knochenmarkes und schwächten so zusätzlich die Abwehrkraft des Organismus. Bei Behandlung von Mäusezytomegalieviruserkrankungen mit Ara-C (87) bzw. Ara-C und IDU (53) kam es zu einer Zunahme der Letalität. Bei Ara-C (87) konnte gezeigt werden, daß diese Substanz zu einer Unterdrückung der humoralen Immunität führen konnte.

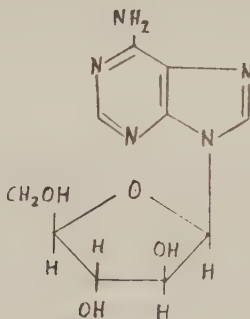
Vidarabin, ein Purinnucleosid, wurde 1960 synthetisiert und zunächst als mögliches Antikrebsmittel erforscht. Bei der Testung auf seine antivirale Wirkung zeigte es sich, daß sein antivirales Spektrum sich zum Beispiel dem des Ara-C überlegen zeigte (77). Auffallend war vor allem, daß seine immunsuppressive Wirkung sich als deutlich geringer als bei den oben genannten Virostatika erwies. Außerdem griff es Zellen mit hoher Teilungsrate nicht so schnell an (22).

Dies schien nun für die Behandlung auch von CMV-Erkrankungen von besonderer Bedeutung zu sein, da bekannt ist, daß sich CMV-Erkrankungen unter Immunsuppression deutlich verschlechtern, nicht zuletzt wegen zunehmender Virusvermehrung (6, 87, 88, 104).

I. Vidarabin - ein potentes Virostatikum mit geringer Toxizität

1. Chemie

Vidarabin wurde von der Firma Parke, Davis & Company entwickelt. Chemisch handelt es sich bei Vidarabin um das 9- β -D-ara-binofuranosyl-adenine - Monohydrat mit der Strukturformel:



und der Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

In der Literatur wurde meistens der Name adenine arabinoside und dessen Abkürzung Ara-A gebraucht, die wir auch in der Folge benützen werden. Die US Adopted Names Council billigte für Ara-A den generic name Vidarabine, während die Firma Parke, Davis & Co. den Handelsnamen Vira-A^R, und für das Augenpräparat den Handelsnamen Vira-ATM (ophtalmic ointment 3 %) festlegte.

2. Antivirale Mechanismen

Die antiviralen Mechanismen erwiesen sich als sehr komplex und vielfältig. Man nimmt an, daß die aktiven Komponenten, die die Virusvermehrung verhindern, die phosphorylierten Derivate von Ara-A sind. Mehrere mögliche Mechanismen wurden postuliert:

- a) die kompetitive Hemmung der Virus-DNS-Polymerase (78)
- b) die Hemmung der RNS-Reduktase (35)
- c) der Einbau von phosphorylierten Ara-A-Derivaten in die Virus-DNS (78)

Der stärkste virostatistische Einfluß dürfte durch die Hemmung der DNS-Polymerase ausgeübt werden. Dabei scheint Ara-A selektiv auf den DNS-Stoffwechsel der Viren, aber kaum auf den eukaryoten DNS-Stoffwechsel zu wirken (10, 78, 79, 89).

3. Pharmakologie und Metabolismus

Ara-A ist ein kristallines Pulver mit sehr eingeschränkter Wasserlöslichkeit (0,5 mg/ml). Oral gegeben, wird es schlecht und unregelmäßig resorbiert, sodaß es parenteral gegeben werden muß. Andererseits passiert Ara-A bei perkutaner Anwendung auch die Haut, ebenso die Blut-Hirn-Schranke (29, 112). Allerdings ergab sich bei oraler Anwendung bei der Ratte für die Leber die prozentual höchste Anreicherung (36).

Nach parenteraler Anwendung wird Ara-A sehr schnell zu Ara-Hx deaminiert. Da nach i.v.-Injektion die Konzentration von Ara-A am Anfang in den roten Blutkörperchen wesentlich höher ist, und ein gleicher Plasmaspiegel erst nach 15 min. erreicht wird (9), nimmt man an, daß dort die Hauptdeamination stattfindet.

Der Plasmaspiegel beträgt nach i.v.-Applikation von 10 mg/kg als 6-Stunden-Infusion $1-6 \mu\text{g/ml}$ für Ara-A und $1-7 \mu\text{g/ml}$ für Ara-Hx.

Weder Ara-A noch Ara-Hx werden stärker an Albumin gebunden, doch sind 41 - 48 % in die Erythrozyten aufgenommen (36).

Aufnahme in die Gewebe:

Bei den Tierversuchen ergaben sich die höchsten Gewebekonzentrationen in der Reihenfolge Niere, Milz und Leber (36). In der Leber wurde jedoch eine größere Konzentration festgestellt als es dem Verhältnis der Durchblutung entsprechen würde. Im Gehirn fand man nur eine geringe Konzentration der Metaboliten. Daraus wurde die Folgerung gezogen, daß Ara-A unfähig ist, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Dies steht jedoch im Widerspruch zu anderen Ergebnissen (29, 39, 72, 109).

Ara-A wird nur zu einem sehr geringen Teil der Gesamtdosis in Nukleoside, Nukleotide und Nukleinsäuren eingebaut, wie Versuche mit radioaktiv-markiertem Ara-A zeigten (21), doch gilt dieser Stoffwechselweg als wichtiger Schritt für die antivirale Aktivität. Beobachtungen von Waquar und Mitarb. (119) lassen annehmen, daß Ara-A-Nukleotide in die DNS eingebaut werden. Brink und Le Page (9) fanden Ara-A in Ribosylnukleotiden. Schabel (103) wies eine antivirale Aktivität von Ara-Hx nach. Die Frage ist, ob eine Reamination stattgefunden hat, da bei Benutzung des Deaminase-Inhibitors Coformyzin ein Ansteigen der antiviralen Aktivität gezeigt werden konnte (115).

Ausscheidung:

Ara-A wird im Blut zu Ara-Hx deaminiert. Sowohl Ara-A als auch Ara-Hx werden über die Niere ausgeschieden. So fand man zum Beispiel bei Mäusen nach 15 min. bis einer Stunde nach Ara-A Applikation 83 % Ara-Hx und 17 % Ara-A im Urin (36). Weitere Spaltprodukte wurden im Urin nicht gefunden (9).

4. Toxizität

Tierversuche mit Mäusen ergaben, daß Einzeldosen von 1000 mg/kg, parenteral gegeben, gut toleriert werden. Die orale LD₅₀ bei Mäusen ergab 5020 mg/kg in einer Studie, in einer anderen 7950 mg/kg. Die parenterale LD₅₀ liegt bei 4670 mg/kg für Mäuse.

Bei einer 28-tägigen Behandlung von Mäusen mit oralen Dosen zwischen 170 und 1400 mg/kg zeigte sich nur eine leichte Leukozytose und Lymphopenie und eine dosisabhängige, geringfügige Erhöhung der alkalischen Phosphatase und der Transaminasen. Histologisch wurden dabei wenig definierbare Leberzellabnormalitäten festgestellt. Bei sehr hohen Dosierungen (1600 mg/kg über 28 Tage) wurden allerdings stark vergrößerte Leberzellen gefunden, ein Befund, der der Vergiftung mit gewissen Alkaloiden ähnelte. Dieser pathologische Befund normalisierte sich erst nach einem Jahr. Des weiteren wurden in diesem Versuch Gonadenatrophien gefunden (6).

In einer früheren Studie zeigten Brink und Le Page (9) in einem Versuch mit Mäusen, daß eine i.p.-Gabe von 240 mg/kg für 6 Tage einen Gewichtsverlust von 24 % bewirkte, der sich nach Absetzen vollständig zurückbildete und den er als Folge einer gestörten Nahrungsaufnahme deutete.

Ara-A ist teratogen bei Ratten und Kaninchen, aber offensichtlich nicht bei Rhesusaffen (64). Dennoch schien diese Tierart für Ara-A am sensibelsten zu sein, dann schon ab 25 mg/kg Ara-A entwickelten sich zunehmend neurotoxische Phänomene wie Tremor, Schwäche und Inkoordination. Für diese klinischen Erscheinungen konnten allerdings weder laborchemische Untersuchungen noch makroskopische und mikroskopische Autopsiebefunde eine Erklärung finden. Diese neurotoxischen Nebenwirkungen wurden auch beim

Menschen gefunden (67, 99). Sie äußerten sich in Tremor, Ataxie und Aphasie und schienen dosisabhängig zu sein.

Sonstige Nebenwirkungen beim Menschen bestanden in Übelkeit, Appetitlosigkeit und Erbrechen, in Schwäche und Gewichtsverlust sowie vereinzelt, infusionsbedingten Thrombophlebitiden (99).

Anlässlich von Behandlungen schwerer Herpesinfektionen wurde kein wesentlicher toxischer Einfluß auf Leber, Niere und Blut festgestellt (21, 124, 125).

Überraschenderweise fand sich nur eine geringe Toxizität von Ara-A bezüglich des Abwehrapparates bzw. auf den Immunmechanismus. In therapeutischen Dosen gegeben, wurde weder eine signifikante Änderung der Leukozytenzahl und des Differentialblutbildes, noch ein signifikanter Anstieg der Serumimmunglobuline IgG, IgA und IgM gefunden (21); auch die zelluläre Immunität scheint nicht durch Ara-A angegriffen zu werden (118).

Ross (99) berichtet allerdings bei höheren Dosen von Ara-A über Megaloblastenbildung im Knochenmark und zwar in allen Zelllinien; diese hatten allerdings noch keine Auswirkung auf das periphere Blutbild. Erst in höherer Dosierung, wie sie bei Tumorbehandlungsversuchen verwendet wurde, konnte im peripheren Blutbild ein Abfall von Leukozyten und Thrombozyten beobachtet werden (37).

5. Virostatische Wirksamkeit von Ara-A:
in vitro, in Tierversuchen und in klinischen Studien

Ara-A erwies sich bei Zellkulturstudien als effektiv bei einigen der mittleren und größeren DNS-Viren, so zum Beispiel beim Zytomegalievirus, dem Vacciniavirus, dem menschlichen Herpes-Virus-Typ I und Typ II, dem Simian-Herpes-Virus, sowie dem Rous-Sarcoma-Virus (einem RNS-Tumorvirus, das von der DNS-Synthese abhängig ist). Das Herpes-Virus Typ II und das Zytomegalievirus schienen allerdings etwas mehr resistent zu sein. Gegen RNS-Viren erwies sich Ara-A nicht wirksam (33, 69, 71, 77, 90).

Auch in Tierversuchen konnte die Wirksamkeit von Ara-A gegenüber einigen von DNS-Virus induzierten Viruserkrankungen gezeigt werden. Sidwell und Mitarbeiter (108) berichteten bei intrakorneal mit Herpes-Simplex-Virus infizierten Hamstern von einem signifikanten Rückgang sowohl der Mortalität als auch der mittleren Überlebenszeit nach lokaler Anwendung von Ara-A. Bei behandelten Tieren ließ sich auch kein Virus mehr aus dem Gehirn isolieren. Bei intracerebral mit Vaccinia-Virus infizierten Mäusen beobachteten Dixon und Mitarbeiter (29) einen signifikanten Rückgang der Morbidität nach systematischer Anwendung von Ara-A, und Klein und Mitarbeiter (57) erzielten bei intrakutaner Injektion von Vaccinia-Viren bei Kaninchen einen Rückgang von Pusteln; bei intraperitonealer Anwendung von Ara-A traten die Pusteln zum Teil gar nicht mehr auf. Bei intrazerebral mit HSV infizierten Mäusen fanden Sloan und Mitarbeiter (112) ebenfalls eine signifikante Reduktion der Mortalität sowohl nach intraperitonealer, subcutaner als auch oraler Applikation von Ara-A. Sie fanden dabei auch eine signifikante Reduktion des Virustiters im Gehirn. In dieser Studie wurde auch IDU getestet, das sich als völlig inaktiv

erwies. Noch bessere Ergebnisse erreichten Griffith und Mitarbeiter (39). Sie konnten u. a. eine völlige Reduktion des Virustiters im Gehirn erzielen, ganz im Gegensatz zu dem ebenfalls getesteten Cytosin-Arabinosid (Ara-C), das den Virustiter gegenüber unbehandelten Tieren sogar noch ansteigen ließ.

Es liegen auch schon eine Reihe von klinischen Studien über Anwendungsversuche mit Ara-A bei DNS-Virusinfektionen vor. Bisher am besten untersucht ist die positive Wirkung von Ara-A bei der Behandlung von Herpes-Keratitiden, wo Ara-A inzwischen das Mittel der Wahl ist (52, 85, 86).

Ermutigende Ergebnisse gibt es teilweise auch bei progressiven Schleimhauterkrankungen auf Grund von Herpes-Simplex-Virus Typ I und bei Herpes-Zoster-Erkrankungen (21, 22, 24).

Weniger ermutigend waren Therapieversuche von genitalen und anorektalen Ulzera auf Grund von HSV-Typ II-Infektionen.

Auch bei der Behandlung von Neugeborenen-Herpes-Simplex-Infektionen konnten mit Ara-A Erfolge erzielt werden (3, 23), sowohl bei lokalisierten Affektionen als auch bei generalisierten Infektionen (21, 23).

Eine in jüngster Zeit durchgeführte Doppelblindstudie zeigte bei Behandlung von Herpes-Simplex-Enzephalitiden mit Ara-A einen Rückgang der Letalität von 70 % auf 29 % (125). Bei problematischen VZ-Infektionen (z. B. generalisierter Herpes-Zoster bei immunsuppressiver Therapie) konnten ebenfalls gute Erfolge unter Ara-A Therapie erreicht werden (124).

Auch bei CMV-Erkrankungen wurden schon erste Behandlungsversuche mit Ara-A unternommen. Ch'ien und Mitarbeiter (19) berichten von 17 Patienten, von denen 12 mit Ara-A behandelt wurden.

Darunter befanden sich zwei Patienten mit klinischer Mononukleose, 5 Patienten mit disseminierten Infektionen, die zugleich wegen anderer Erkrankungen (z. B. chronische Glomerulonephritis, chronischer Pyelonephritis und Nephrosklerose) in immunsuppressiver Behandlung waren, und 5 Patienten mit kongenitaler Zytomegalie. Dabei konnte bei Patienten mit Mononukleose und denen mit kongenitaler Zytomegalie ein schrittweiser Rückgang der Virusausscheidung bis zum völligen Rückgang erzielt werden. Nach Absetzen von Ara-A stieg der Virustiter im Urin allerdings wieder etwas an, jedoch nicht mehr auf die Ausgangshöhe. Auch klinisch und laborchemisch zeigte sich bei einigen dieser Patienten eine leichte Besserung.

Bei den immunsuppressiv behandelten Patienten konnte nur ein leichter Rückgang der Virusausscheidung erzielt werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten Baublis und Mitarbeiter (6) bei 22 Patienten.

Eine neuere Studie über eine prophylaktische Ara-A Gabe bei knochenmarktransplantierten Patienten zeigte keinen Rückgang der Letalität. Die Patienten starben an schweren Pneumonien (60). Allerdings konnte wegen der Knochenmarksschwächung nur eine vergleichsweise niedrige Dosis von Ara-A gegeben werden.

In den ersten beiden Studien über CMV-Erkrankungen konnte also zum mindesten der antivirale Effekt von Ara-A auf die Virusausscheidung gezeigt werden, sowohl im Urin als auch im Pharynx, vorausgesetzt, die Virusexkretion in diesen Gebieten ist nicht zu hoch und es wird eine angemessen hohe Dosis über einen längeren Zeitraum angewandt.

Der therapeutische Effekt, wenn überhaupt vorhanden, scheint allerdings mit der Schwere der Erkrankung, vor allem bei geschwächter Immunlage, abzunehmen.

1. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die Studien von Ch'ien (19) und Baublis (6) zeigen, daß es sehr schwierig ist, bei CMV-Erkrankungen einen spezifischen Behandlungserfolg zu beweisen, da sowohl die Verlaufsformen in Art, Dauer, Schwere und Sitz der Erkrankung zu stark differieren, als auch der natürliche Abwehrmechanismus unterschiedlich ausgeprägt ist. Die Schwierigkeit einer richtigen Interpretation liegt darin, daß es bisher noch nicht gelungen ist, den exakten Infektionsablauf der Zytomegalie zu verstehen (3, 120).

Es schien deshalb gerechtfertigt, die Wirkung von Ara-A auf die Zytomegalievirusinfektion in einem kontrollierten Tierexperiment zu überprüfen um damit einen gleichbleibenden Infektionsverlauf (44), eine bessere Kontrolle des klinischen Verlaufes und eine effektive Therapiekontrolle durch Bestimmung des Virusgehaltes aus Zielorganen gewährleisten zu können.

Wegen der strengen Artspezifität kann das menschliche Zytomegalievirus im Tierversuch nicht verwendet werden. Es wurde daher für die Untersuchung das Mäusezytomegalievirus (MCMV) benutzt. Es ist in seinen biologischen und physikalischen Eigenschaften eng mit dem menschlichen Zytomegalievirus verwandt. Die von beiden Viren hervorgerufenen Erkrankungen stimmen im Infektionsablauf gut überein (10, 44).

Bei der Bestimmung des Virusgehaltes verwendeten wir in dieser Untersuchung die Leber der Versuchstiere, weil sie als das meist betroffene Organ neben der Milz gilt (44, 47, 100, 104) und sie auch als Ursache für Todesfolgen bei Zytomegalie-Infektionen vermutet sowie als Gradmesser für den klinischen Verlauf angesehen wird (83).

Das Ziel des im folgenden beschriebenen experimentellen Tierversuches bestand nun darin:

1. die Wirkung von Ara-A auf die subletale Zytomegalievirusinfektion der Maus
 - a) hinsichtlich des Allgemeinverhaltens und der Letalität
 - b) hinsichtlich des Virusgehaltes in der Leberzu überprüfen.
2. Einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Virusgehalt in der Leber und dem Allgemeinverhalten bzw. der Letalität aufzuzeigen.
3. In einem weiteren Versuch sollte die Wirkung von Ara-A auf das Immunsystem an Hand der Überprüfung der Produktion hämolysierender Antikörper festgestellt werden.

B Experimenteller Teil

I. Material und Methodik

Versuchstiere

Erwachsene, weibliche Mäuse des Inzuchtstammes NMRI mit einem durchschnittlichen Gewicht von 28 - 32 g der Versuchstieranstalt Willi Gassner, D-8741 Sulzberg.

Medikament

Die Firma Parke, Davis & Company stellte Vidarabine unter dem Handelsnamen Vira-A^R in Form einer sterilen, wässrigen Suspension (2 g kristallines 9- β -D-arabinofuranosyl-adenine-Hydrochlorid in 5 ml Suspension) zur Verfügung.

Virus

Mäusezytomegalievirus (MCMV) vom Stamm Smith (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A.). Das Virus löst bei 1 Tag alten Saugmäusen eine tödliche Erkrankung, bei erwachsenen Mäusen eine chronische, subletale Infektion aus. 1 ml der Virussuspension enthielt $3,5 - 98 \times 10^6$ Plaque-bildende Einheiten (PbE).

Medium

Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) mit 0,075 % Natriumbikarbonat, 100 g/ml Streptomycin und 100 E/ml Penicillin. Dem Wachstumsmedium wurde 10-%iges, dem Erhaltungsmedium 2-%iges fetales Kälberserum zugesetzt.

Zellkulturen

Sie bestanden aus einschichtigen Zellrasen von Mäuseembryonalzellen. Diese wurden gewonnen durch sterile Entnahme der Mäuseembryonen mit durchschnittlicher Größe von 0,5 - 0,8 cm, deren

mechanischer Zerkleinerung und anschließender Auflösung in Einzelzellen mittels Trypsin. Nach Zugabe von Wachstumsmedium wuchsen die Einzelzellen (der Menge nach zirka 10 Embryonen entsprechend) in Rouxflaschen (18 x 11,5 cm) nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei einer Temperatur von 37° C zu einem einheitlichen Zellrasen heran. Aus diesen Primärkulturen konnten mittels erneuter Trypsinierung weitere Subkulturen gewonnen werden. Zur Anwendung kamen die 2. bis 5. Subkultur, sowohl für die Viruszüchtung als auch für die Plaques-Tests.

Overlay

Es handelt sich um gelartige Methylzellulose, versetzt mit Wachstumsmedium. Es soll verhindern, daß sich die Viren, anstatt nur von Zelle zu Zelle, auch über den wässrigen Überstand vermehren. Gleichzeitig dient es zur Ernährung der Zellrasen.

Herstellung:

4 g Methylcellulose, 4000 Centipoises, der Firma Dow, Midland, Mich., U.S.A., werden in 100 ml destilliertem Wasser suspendiert und bei 121° C 20 min. lang autoklaviert. Nach Abkühlung auf 4° C kommt doppelt konzentriertes Wachstumsmedium hinzu. Im Eisbad erfolgt mit Hilfe des Magnetrührers eine vollständige Durchmischung. Der 20-%ige Overlay ist glasklar, bei einer Temperatur von 4° C halbflüssig und bei 37° C fest (Methode nach Garabedian) (34).

Organsuspension

Jeweils zwei Tieren wurde nach Tötung ein Stückchen Leber entnommen (zusammen jeweils etwa 1 g), diese in einem Tenbrockblender (Bellco, Vineland, N.Y., U.S.A.) zerrieben und mit Erhaltungsmedium auf eine 20-%ige Suspension eingestellt. Davon wurden Verdünnungen von 10⁻¹ und 10⁻² hergestellt und die Monolayer damit beimpft.

Histologische Untersuchungen

Lebergewebe wurde in 10-%igem Formalin fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Anschließend erfolgte die Einbettung in Methylakrylat.

Plaque-Test

Einschichtige Zellrasen (Monolayer) von Mäuseembryonalzellen, hergestellt in Roux-Flaschen nach oben angegebener Methode, werden in rechteckigen, verschließbaren Plastikfläschchen der Firma Nunc (Größe: 4 x 6,5 cm) angelegt und zwar nach der oben angegebenen Teilungsmethode.

Nach Abgießen des Wachstumsmediums werden die Monolayer mit 0,2 ml Virus- oder Gewebesuspensions-Verdünnungen beimpft und eine Stunde bei 37° C inkubiert. Nach Entfernen des restlichen Überstandes werden die Zellrasen mit 8 ml Overlay beschichtet und anschließend wieder inkubiert. Nach einem Tag wird noch einmal mit 8 ml Overlay beschichtet.

In den infizierten Kulturen traten die ersten Plaques nach 3 bis 4 Tagen auf und erreichten am 6. Tag einen Durchmesser von 0,2 bis 0,6 mm.

Zu diesem Zeitpunkt wurden die Plaques unter dem Inversionsmikroskop mit der Vergrößerung 1 : 36 gezählt. Zur Erleichterung der Auszählung wurde ein auswechselbares, durchsichtiges Raster, das unter die Kulturfläschchen gesteckt werden konnte, benutzt.

Bestimmung hämolysierender Antikörper mit Mikrotestmethode

Die Titerbestimmungen erfolgten nach der von Adler beschriebenen Methode (2). Als Modifikation benützten wir eine Mikromethode

(Microtiter System Cooke Engineering Comp. U.S.A) mit folgenden Mengen und Konzentrationen: 0,025 ml Serumverdünnung, 0,025 ml 1,5-%ige Schaferythrozytensuspension, 0,025 ml Meerschweinchenkomplement 1 : 10. Alle weiteren Versuchsbedingungen blieben unverändert. Als Titerendstufe wurde die letztmalige Hämolyse gewählt.

Statistische Tests

1. Beim Versuch über die Wirkung von Ara-A auf das Immunsystem wurde für den Vergleich der Antikörpertiter der t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte unabhängiger Stichproben angewandt (101).
2. Zur Überprüfung auf unterschiedliche Letalität zwischen behandelten und unbehandelten Tieren kam der Chi-Quadrat-Test (101), sowie die Mantel-Haenszel-Prozedur (73) zur Anwendung.
3. Für den Vergleich der Viruslebertiter wurde der Wilcoxon-matched-pairs-signed-ranks-Test angewandt (101).

II. Versuchsaufbau

1. Wirkung von Ara-A auf die humorale Immunität der Maus

Je einer Kontrollgruppe von 10 Mäusen und einer Versuchsgruppe von 10 Mäusen wurden pro Tier 5×10^8 Hammelerythrozyten intraperitoneal injiziert. Anschließend bekamen die Mäuse der Versuchsgruppe 500 mg/kg Ara-A für 5 Tage intraperitoneal injiziert und die der Kontrollgruppe je 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung.

Am 4., 7., 11. und 14. Tag wurde den Tieren jeweils venöses Blut vom retrobulbären Sinus entnommen und das Serum von je zwei Tieren gepoolt. Aus diesen gepoolten Seren bestimmten wir jeweils die Antikörpertiter (Hämolsine) mittels der Mikrotestmethode.

2. Wirkung von Ara-A auf die Letalität der MCMV-infizierten Mäuse

Aus einer Grundgesamtheit von 95 Mäusen wurden in 4 Versuchsserien jeweils 2 Gruppen von je 10 - 20 Tieren gebildet. (Versuchsserie 1 - 4). Die Tiere beider Gruppen wurden am 0. Tag mit 1 ml MCMV-Suspension entsprechend $3,5 - 98 \times 10^6$ PbE/ml intraperitoneal infiziert.

Versuchsgruppe: Die Tiere erhielten 1 Stunde nach der Infektion, sowie die darauffolgenden vier Tage 1 ml Ara-A entsprechend 500 mg/kg intraperitoneal injiziert. (Diese Dosis zeigte sich bei vielen vergleichbaren tierexperimentellen Studien als therapeutisch optimal und nicht toxisch.) (39, 41, 57, 72, 83, 112, 113).

Viruskontrollgruppe: Diese Tiere erhielten 1 Stunde nach der Infektion sowie an den darauffolgenden Tagen je 1 ml physiologische Kochsalzlösung.

Eine weitere Medikamenten-Kontrollgruppe wurde nicht infiziert,

bekam aber ebenfalls 5×500 mg/kg Ara-A i.p. injiziert.

Die Tiere wurden insgesamt 12 Tage lang beobachtet, die gestorbenen Tiere registriert und ausgesondert.

3. Virustiter (Plaque-) -Bestimmung der Mäuseleber

Aus einer Grundgesamtheit von 343 Tieren wurden jeweils zwei Gruppen von je 5 - 15 Tieren gebildet (Versuchsserie 5 - 17).

Die Viruskontrollgruppe beimpften wir wie oben beschrieben mit MCMV, die Versuchsgruppe bekam zusätzlich Ara-A in bekannter Dosierung.

In beiden Gruppen wurden jeweils am 4. und 6. Tag zwei Tiere, die zu Versuchsbeginn gesondert gekennzeichnet worden waren, getötet, je ein Stückchen Leber entnommen, die Leberstückchen von je zwei Tieren einer Gruppe gepoolt, eine Suspension, wie oben geschrieben, hergestellt und daraus die Plaques-bildenden Einheiten (PbE/ml) nach oben beschriebener Methode bestimmt.

Die verbliebenen Tiere wurden ebenfalls nach Allgemeinverhalten und Letalität beobachtet (Tab. IV).

Um bakterielle Kontaminationen oder Superinfektionen auszuschließen, ließen wir repräsentative Organsuspensionen am bakteriologischen Labor der Universitätskinderklinik/München untersuchen.

4. Histologische Untersuchung

Aus der Versuchsserie 11 wurden am 4. und 6. Tag zusätzlich einige Leberproben entnommen und anschließend im Pathologischen Institut der Universität München histologisch untersucht.

III. Ergebnisse eigener Untersuchungen

1. Wirkung von Vidarabin auf die humorale Immunität der Maus

Bei der Prüfung des Einflusses von Vidarabin (Ara-A) auf die humorale Immunität der Mäus an Hand der hämolysierenden Antikörper zeigte sich, daß bei Anwendung von Ara-A in der gewählten Dosierung von 5 x 500 mg/kg an keinem der Untersuchungstage ein Titerabfall festzustellen war (Tab. I).

Die Mittelwerte der Hämolysintiter von behandelten und unbehandelten Tieren wichen an keinem der Untersuchungstage über eine Titerstufe voneinander ab und zeigten kein divergierendes Verhalten (Abb. 1).

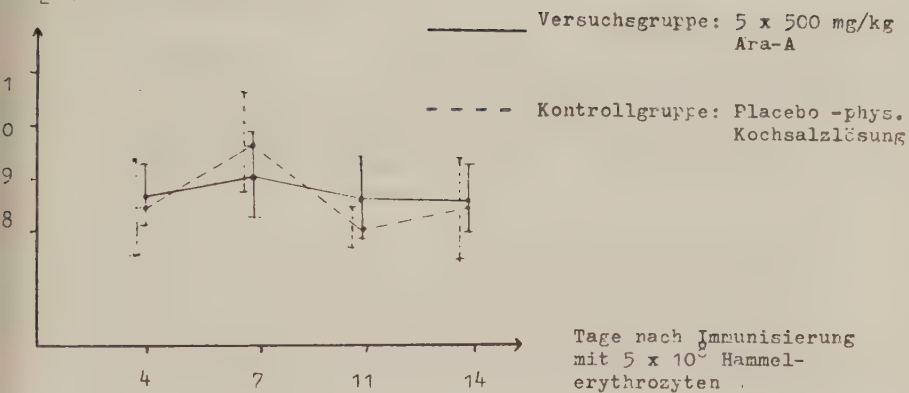
Auch die statistische Auswertung mittels t-Test zeigte bei den mit Ara-A behandelten Tieren keinen signifikanten Hämolysintiterabfall (Tab. II).

Insgesamt zeigt obiger Versuch, daß die Behandlung der Maus mit Ara-A zu keiner Unterdrückung der humoralen Antikörperbildung führt, die immunologische Primärantwort also nicht gestört wird.

Tage nach Immunis. mit 5 x 10 ⁸ Hammel- Erythrozyten	<u>Kontrollgruppe</u> (10 Mäuse, Serum von je 2 Tieren gepoolt)		<u>Versuchsgruppe</u> (10 Mäuse, Serum von je zwei Tieren gepoolt)	
	<u>unbehandelt</u>		<u>5 x 500 mg/kg Ara-A</u>	
<u>4. Tag</u>	Titer	(log ₂)	Titer	(log ₂)
	1 : 256	8	1 : 512	9
	1 : 256	8	1 : 512	9
	1 : 1024	10	1 : 256	8
	1 : 512	9	1 : 512	9
	1 : 256	8	1 : 512	9
<u>7. Tag</u>				
	1 : 2048	11	1 : 1024	10
	1 : 2048	11	1 : 512	9
	1 : 1024	10	1 : 256	8
	1 : 512	9	1 : 512	9
	1 : 256	8	1 : 1024	10
<u>11. Tag</u>				
	1 : 256	8	1 : 512	9
	1 : 512	9	1 : 256	8
	1 : 256	8	1 : 256	8
	1 : 256	8	1 : 512	9
	1 : 256	8	1 : 1024	10
<u>14. Tag</u>				
	1 : 256	8	1 : 512	9
	1 : 1024	10	1 : 256	8
	1 : 512	9	1 : 512	9
	1 : 256	8	1 : 512	9
	1 : 256	8	1 : 256	8

Tab I: Hämolysierende Antikörper gegen Hammelerythrozyten
bei NMRI-Mäusen mit und ohne Ara-A Behandlung (5x500mg/kg)

Reziproker
Titer
 $\log_2 \pm s$



Ab. 1: Mittelwerte hämolysierender Antikörper gegen Hammelerythrozyten bei NMRI-Mäusen mit und ohne Ara-A Behandlung

Tag nach Immunisierung mit Hammelerythrozyten	t-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeit p
4.	0,45	0,05
7.	0,90	0,05
11.	1,40	0,05
14.	0,00	0,00

Ab. II: Statistischer Vergleich der Mittelwerte der Antikörpertiter mittels t-Test

2. Wirkung von Ara-A auf die mit MCMV infizierte Maus

a) Allgemeinverhalten

Die Kontrolltiere, die nur Ara-A erhielten, hatten bis zum 5. Tag leicht an Gewicht abgenommen, von durchschnittlich 30 g auf 28 g, zeigten aber außer einem manchmal leicht struppigen Fell keine auffallenden klinischen Erscheinungen.

Die mit MCMV infizierten Tiere (Viruskontrollgruppe) zeigten je nach inokulierter Virusmenge ein unterschiedliches Gewichtsverhalten. Bei Virusmengen bis zu 30×10^6 PbE/ml kam es erst zur Gewichtszunahme (von 30 g auf 34 g). Tiere mit höherer Virusmenge nahmen zum Teil bis zum 5. Tag an Gewicht ab, von 30 g auf 26 g. Im übrigen zeigten diese Tiere nach 3 - 4 Tagen ein struppiges Fell, eine leicht schlaffe Haut und manchmal eine leichte Krümmung des Rückens. Die Tiere, die überlebten, erholten sich meist nach 10 Tagen und kamen wieder in einen guten Zustand.

Bei den Tieren, die zusätzlich mit Ara-A (500 mg/kg für 5 Tage) behandelt wurden (Versuchsgruppe), zeigte sich nach 5 Tagen ein deutlicher Gewichtsverlust von durchschnittlich 30 g auf 23 g. Sie bekamen schon nach 1 - 2 Tagen ein stark struppiges und lappiges Fell und einen hohen, gekrümmten Rücken. Außerdem zeigten sie sich am 4. - 5. Tag zunehmend apathisch mit ataktischem, taumelndem Gang. Auch nach Absetzen von Ara-A am 4. Tag konnten sich die Tiere, soweit sie überlebten, meist nicht mehr von ihrem schlechten Zustand erholen, d. h. sie blieben kleiner und apathischer als gesunde Tiere.

b) Pathologische Befunde

Makroskopisch:

Bei den Tieren der Viruskontrollgruppe zeigte sich die Leber stark vergrößert bei normaler Farbe. Die Milz war ebenfalls stark vergrößert. Bei einigen Tieren hatte sich auch ein Ascites entwickelt.

Bei den Tieren, die mit Ara-A behandelt wurden (Versuchsgruppe) fand sich meist eine deutlich verkleinerte Leber mit grober Oberfläche und graugelber Farbe. Die Milz zeigte alle Größenvariationen von normal bis groß, schien im Durchschnitt jedoch kleiner zu sein als bei der Gruppe der Nicht-Behandelten.

Histologische Ergebnisse:

Die Leberentnahme zur histologischen Untersuchung wurde in der Versuchserie 11 entnommen.

Für die unbehandelten, mit MCMV infizierten Mäuse ergab sich für den 4. Tag nach Infektion folgendes histologisches Bild der Leber: Unregelmäßig entzündliche Leber mit Auftreten von Lymphozyten, Histozyten und Granulozyten, intranukleäre Einschlusskörperchen, wobei die Zellen meist nicht vergrößert waren. Häufig mehrkernige Hepatozyten im Bereich entzündlicher Veränderungen mit zum Teil vergrößerten Zellen (Zytoplasmavermehrung). Die Hepatozyten wiesen häufig feintropfige Vakuolisierungen auf. Leberzellnekrosen traten nur vereinzelt auf.

Für die zusätzlich mit Ara-A behandelten Tiere (Versuchsgruppe) ergab sich für den 4. Tag nach Infektion folgendes Bild: Das histologische Bild ähnelte dem oben beschriebenen Bild für die unbehandelten Tiere. Bei einem Schnitt blieb die Anzahl der Einschlusskörperchen dieselbe, doch traten eine verstärkte Vakuolisierung der Hepatozyten, stärkere Kerngrößenschwankungen und stärkere entzündliche Infiltrate auf.

In einem anderen Schnitt (anderes Tier) fanden sich keine Einschlusskörperchen mehr, jedoch eine deutlich verstärkte feintropfige Vakuolisierung und deutlich vermehrte Zellnekrosen.

Am 6. Tag nach MCMV-Infektion zeigte sich bei den unbehandelten Tieren dasselbe histologische Bild wie bei den unbehandelten Tieren des 4. Tages. Die Leberzellnekrosen waren etwas weniger. Bei einem Tier zeigten sich zum Teil nur noch schattenhaft erkennbare Einschlusskörperchen.

Bei den mit Ara-A behandelten Tieren bot sich das Bild wie bei den behandelten vom 4. Tag. Es zeigten sich aber keine Einschlusskörperchen mehr (bei beiden Tieren).

Die Vakuolisierung war weniger deutlich. Die Leberzellnekrosen waren mehr gruppenförmig angeordnet mit sogenannter Entlastungshyperämie. Bei einem Tier waren nur noch vereinzelte Leberzellnekrosen zu sehen.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß sich bei beiden Gruppen, behandelten wie unbehandelten, eine diffus entzündliche Leber zeigte, wobei in den Schnitten

der mit Ara-A behandelten Tiere im Durchschnitt weniger Einschlußkörperchen nachzuweisen waren, aber eine deutlich stärkere Entzündung mit vermehrten Zellnekrosen zu verzeichnen war. Leberschnitte von Tieren der Medikamentenkontrollgruppe, die nur Ara-A bekamen, wiesen nur sehr mäßig entzündliche Veränderungen (wie auf toxischer Basis) auf.

c) Letalität

Die Behandlung von Mäusen, die mit subletalen Dosen von MCMV infiziert wurden, mit Ara-A führte zu keinem Rückgang der Letalität. Sie führte im Gegenteil zu einer deutlichen Zunahme.

Während bei den nur mit MCMV infizierten Mäusen ohne Behandlung nur 8 % der Tiere starben, starben bei den mit Ara-A behandelten Tiere 25 % (Tab. III).

Mit MCMV infiz. Mäuse ohne Behandlung		Mit MCMV infiz. Mäuse unter Behandlung mit 5 x 500 mg/kg Ara-A		Versuchs- nummer
Anzahl der Tiere	Gestorben	Anzahl der Tiere	Gestorben	
10	0	10	6	1
10	0	10	1	2
20	2	19	3	3
8	2	8	2	4
48	4 (8 %)	47	12 (25 %)	

Tab. III: Letalität von mit MCMV-infizierten NMRI Mäusen mit und ohne Ara-A Behandlung.

(MCMV $\hat{=}$ 10^6 PbE/ml; Ara-A $\hat{=}$ 5 x 500 mg/kg)

Die mit Ara-A behandelten Tiere starben auch wesentlich früher als die nur mit MCMV infizierten Tiere (Abb. 2).

Das Letalitätsmaximum lag bei den mit Ara-A behandelten Tieren am 4. Tag, bei den unbehandelten am 6. - 7. Tag (Tab. IV).

Versuchs- nr.	Anzahl der Mäuse	Anzahl der an den jeweiligen Tagen nach Infektionsbeginn gestorbenen Mäuse											Anzahl der insg gestorb. Mäuse		
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.Tag			
Unbeh.(U) Beh.(B) Tiere		U	B	U	B	U	B	U	B	U	B	U	B	Unbeh. Beh.	
1)	10	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	6
2)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3)	20	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	2	3
4)	8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	2
5)	5	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
6)	10	0	0	0	0	0	0	1	3	0	2	0	0	0	5
7)	10	0	0	0	0	0	5	1	1	0	2	0	0	1	9
8)	10	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	0	0	0	3
9)	8	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
10)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
11)	10	0	0	0	0	1	0	2	0	2	1	0	0	0	6
12)	15	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	0	5
13)	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	2
14)	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
15)	13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
16)	10	0	0	0	0	3	0	3	0	1	0	2	0	0	9
17)	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
191	197	0	0	3	0	5	0	19	2	11	4	12	3	4	47

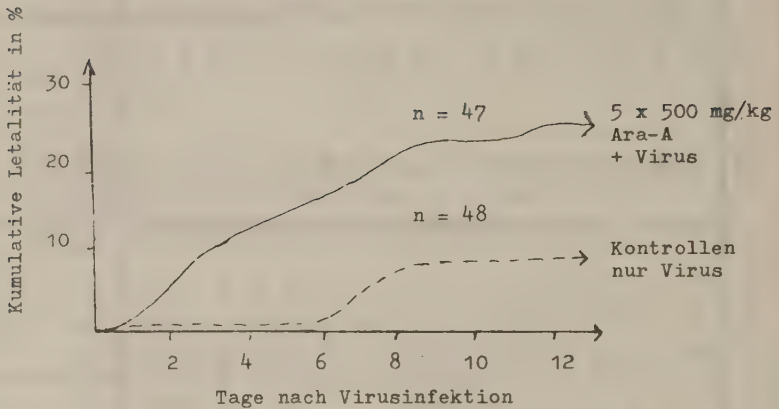


Abb. 2: Kumulative Letalität von NMRI-Mäusen nach Infektion mit dem Mäusezytomegalievirus (MCMV) und Behandlung mit Vidarabine (Ara-A).

(MCMV $\hat{=}$ 10^6 PbE/ml; Ara-A: 5 x 500 mg/kg)

Statistische Auswertung:

Für die statistische Auswertung der Letalität von behandelten und unbehandelten Mäusen in der Versuchsserie 1 bis 4 wurde der Chi-Quadrat-Test, angewandt auf die Gesamtheit der Gruppe, verwendet.

Mit Chi-Quadrat = 5,015 und 1 Freiheitsgrad ergibt sich damit ein signifikanter Unterschied in der Letalität behandelter und unbehandelter Tiere bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

Eine weitere statistische Aussage über den unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der kumulativen Letalität von behandelten und unbehandelten Tieren erlaubt die Mantel-Haenszel-Prozedur. Damit konnten auch die Versuchsserien 5 - 17 in die Auswertung miteinbezogen werden.

Mantel-Haenszel-Prozedur

Tage nach Infektion mit MCMV	Unbehandelte Tiere		Mit 5 x 500 mg/kg Ara-A beh. Tiere	
	Unter Be- obachtung	Gestorben	Unter Be- obachtung	Gestorben
1	191	0	197	0
2	191	0	197	3
3	191	0	194	5
4	189	0	186	19
5	161	2	139	11
6	157	4	126	12
7	125	3	86	4
8	122	2	82	2
9	119	1	79	0
10	118	1	79	0
11	117	2	79	2
12	115	0	77	0

H_0 : Gleiches Überlebensmuster in beiden Gruppen

Chi-Quadrat: 33,2 FG = 1

Damit ergibt sich auch mit diesem Test ein deutlicher Unterschied für den zeitlichen Verlauf der Letalität von unbehandelten und behandelten Tieren (Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$).

Der große Unterschied von 15 gestorbenen Tieren in der Kontrollgruppe bzw. 47 in der Versuchsgruppe deutet allerdings darauf hin, daß das Ergebnis des Tests nicht nur auf einen unterschiedlichen Verlauf, sondern auch auf einen

Unterschied der Letalität nach einem Zeitraum von 12 Tagen zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ist also hinsichtlich der Letalität und der Überlebenszeit festzustellen, daß die Behandlung von mit subletalen Dosen von MCMV infizierten Mäusen mit Vidarabin (Ara-A) zu einer deutlichen Zunahme der Letalität und zu einer Abnahme der Überlebenszeit führt.

Zur Letalität der nur mit Ara-A behandelten Mäuse
(Medikamentenkontrollgruppe)

Was die Letalität von nur mit Ara-A behandelten Tieren angeht, so starben von 69 Tieren drei Tiere ($\approx 4,3\%$). Die drei gestorbenen Tiere traten aber nur in den ersten Versuchsserien auf (bei insgesamt 19 Tieren in diesen Serien) und zeigten zudem keinerlei klinische oder autoptische Auffälligkeiten.

b) Virusgehalt der Leber

In 6 Versuchsserien konnte durch die Vidarabin-(Ara-A)-Behandlung von mit MCMV infizierten Mäusen eine deutliche Reduktion des Virustiters in der Leber gegenüber unbehandelten erreicht werden, in 2 Versuchen gab es keinen Unterschied in den Virustitern und in einem Versuch wies sogar die behandelte Gruppe einen höheren Virustiter auf (Tab. V).

Vers.Nr.	Infektion mit MCMV am 0. Tag $PbE \times 10^6/ml$	<u>Virustiter in der Leber</u> ($PbE \times 10^3/g$ Lebergewicht)			
		4. Tag nach Inf.		6. Tag nach Inf.	
		Nur Virus	Virus + Ara-A	Nur Virus	Virus + Ara-A
5	5,65	57,00	2,35	-	-
6	15,90	163,00	3,14	22,40	1,70
7	6,61	266,00	291,00	0,32	0,00
8	3,00	47,10	4,41	5,35	0,70
9	6,70	1,24	4,50	0,16	0,50
10	8,64	35,70	0,28	0,28	1,03
11	98,30	888,00	8,60	13,90	5,60
12	58,60	290,00	7,50	-	-
13	5,00	0,55	0,05	0,05	0,05
14	5,00	380,00	0,41	-	-
15	11,00	192,00	4,28	0,26	2,20
16	30,00	531,00	529,00	2,66	0,86
17	21,20	18,60	3,60	1,32	0,39

Tab. V: Virusgehalt der Leber von NMRI-Mäusen, die mit dem Mäusezytomegalievirus (MCMV) infiziert wurden, mit und ohne Behandlung mit Vidarabin (Ara-A: 5 x 500 mg/kg)

Am 6. Tag waren die Virustiter in beiden Gruppen, sowohl den behandelten als auch den unbehandelten Tieren, wesentlich niedriger. Auch die Unterschiede der Titer zwischen beiden Gruppen waren deutlich geringer. Zudem zeigte es sich, daß bis zu diesem Zeitpunkt noch keine gänzliche Viruselimination zustandekam, außer in der 7. Versuchsserie. (Tab. V).

Statistische Auswertung

Da die Werte zwischen den einzelnen Versuchsserien stark streuten und auch die Differenzen der Virustiter der behandelten und unbehandelten Tiere nicht normalverteilt waren, wurde für die statistische Auswertung der Wilcoxon-matched-pairs-signed-ranks-Test verwendet.

Für den 4. Tag ergab sich bei $N = 13$ mit $R = 8$ ($R_{0,01} = 12$) ein signifikanter Paardifferenzenunterschied.

Für den 6. Tag ergab sich bei $N = 10$ mit $R = 13$ ($R_{0,05} = 10$) kein signifikanter Paardifferenzenunterschied.

Als Ergebnis der Leberrtitration kann also festgehalten werden, daß Vidarabin (Ara-A) bei einer subletalen MCMV-Infektion der Maus eine teilweise deutliche Viruselimination, bzw. Verhinderung der Virusreplikation in der Leber bewirkt.

Eine vollständige Verhinderung der Virusreplikation in der Leber konnte nicht erzielt werden.

Virustiter im Gehirn

In der Versuchsserie 11 wurde das Gehirn der Tiere am 4. und 6. Tag nach Infektion nach derselben Methode wie bei den Lebern auf Virusgehalt untersucht. Für den 4. Tag ergab sich bei den unbehandelten Tieren ein Virustiter von $0,03 \times 10^3$ PbE/g Gehirngewicht und bei den behandelten ein Virustiter von $0,02 \times 10^3$ PbE/g. Am 6. Tag waren in keiner der beiden Gruppen Plaques zu sehen.

C D i s k u s s i o n

Die vorliegende Studie bestätigt die Erwartungen in Ara-A bezüglich der geringen immunsuppressiven Wirkung. Auch schien ein virostatistischer Einfluß auf die MCMV-Infektion zu bestehen. Die Voraussetzung für die antivirale Wirksamkeit schien also gegeben zu sein.

Trotzdem führte die Behandlung mit Ara-A bei der subletalen MCMV-Infektion (Letalität 10 %) in dieser Studie zu einer eindeutigen Zunahme der Letalität sowie der Abnahme der Überlebenszeit.

Ähnlich ungünstige Resultate hinsichtlich der Letalität erzielten Overall und Mitarbeiter bei Behandlungsversuchen mit Ara-A bei MCMV-infizierten Mäusen (83).

Bei einer letalen Dosis von MCMV (Letalität 93 %) ergab die Behandlung mit 7 x 500 mg/kg, begonnen 2 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach der Infizierung, Letalitäten von 100 %, 87 % und 93 %, sowie eine Abnahme der Überlebenszeit.

Bei einer LD₅₀-Infektion ergab eine Behandlung mit 2 x 250 mg/kg Ara-A für 7 Tage, begonnen vor der Infizierung, bzw. 2 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach der Infizierung, Letalitäten von 86 %, 87 %, 100 % und 87 % bei gleicher Überlebenszeit.

In unserer vorliegenden Studie kam es trotz der ebenfalls deutlichen Zunahme der Letalität bei den mit Ara-A behandelten Tieren zu einem signifikant niedrigeren Virustiter in der Leber unter Ara-A Behandlung, zum mindesten bis zum 4. Tag. Daß die Virusreplikation tatsächlich eingeschränkt wurde, wird auch noch gestützt durch die durchschnittlich geringere Zahl an Einschlußkörperchen in den mit Ara-A behandelten Tieren, wie es unsere histologischen Untersuchungen zeigten.

Bei vergleichbaren tierexperimentellen Studien mit ähnlichen antiviralen Substanzen (IDU und Ara-C) wurde bei Zunahme der Letalität jedoch meist eine Zunahme des Virusgehaltes in den Organen beobachtet (53). Umgekehrt konnten Overall und Mitarbeiter in ihrer Studie zeigen, daß bei einer erfolgreichen Minderung der Virusreplikation in der Leber durch Phosphonoacetic Acid (FAA) auch eine Besserung des klinischen Bildes sowie eine Abnahme der Letalität erreicht werden konnte (83).

Das bedeutet, daß bei antiviralen Substanzen, die zu einer höheren Letalität führten, diese normalerweise durch eine verstärkte Infektiosität bewirkt wurde, und zwar meist auf Grund einer Schwächung des allgemeinen Abwehrapparates, z. B. der Makrophagen (106) oder des Immunmechanismus (45, 47, 82, 87, 88).

Bei MCMV-Infektionen wirkte sich die Infektion vor allem auf die Leber aus (45, 100), da mit zunehmender Virusvermehrung die Schwere des Leberschadens zunahm. Diese Leberschädigung wurde neben einer Splenitis bisher als Haupttodesursache angesehen (45, 100).

Diesen eben aufgezeigten Mechanismus der erhöhten Infektiosität wird man bei Ara-A ausscheiden können, weil, wie in unserer Arbeit gezeigt werden konnte, Ara-A zu keiner Immunsuppression führt und die Virusreplikation in der Leber ja auch tatsächlich eingeschränkt werden konnte.

Zur Erklärung, warum Ara-A trotz signifikanter Unterdrückung der Virusreplikation in der Leber zu einer deutlichen Zunahme der Letalität führt, gibt es mehrere Möglichkeiten.

1. Die Virusreplikation wird zwar in der Leber unterdrückt, nicht aber in anderen Organen. Dafür gibt es Anhaltspunkte (82), doch konnte in einer Versuchsserie in unserer Arbeit an Hand des

Virustiters im Gehirn gezeigt werden, daß die Virusvermehrung in diesem Organ vergleichsweise gering war. Zudem zeigte sich in unserer Studie als auffallendster pathologischer Befund die Leberschädigung. Für die Annahme, daß der Leberschaden der wahrscheinlichste pathogenetische Faktor war, sprechen auch die Ergebnisse von Overall und Mitarbeiter (83), die mit einer Behandlung mit Phosphonoacetic Acid (PAA) eine totale Viruselimination aus der Leber erreichten, während die Virusreplikation in der Lunge, Milz, Nieren, Gehirn und Blut zwar deutlich inhibiert, die Titerhöhe im Durchschnitt aber immer noch höher war als die durchschnittliche Titerhöhe der Leber in unserer Studie.

2. Ara-A ist doch toxischer als bisher angenommen wurde oder jedenfalls zum mindesten im Zusammenwirken mit einer Zytomegalie-Infektion.

Es gibt einige Anzeichen, die darauf hindeuten. In In-Vitro-Versuchen mit Ara-A wurde nicht nur eine Verminderung der Virusvermehrung festgestellt, sondern auch morphologische Zellveränderungen, was bedeuten könnte, daß auf Grund der toxisch veränderten Zellen keine Virusvermehrung mehr stattfinden konnte. (23)

Die in unserer Studie verwendete Ara-A Dosis von 5 x 500 mg/kg war bei vielen vergleichbaren tierexperimentellen Studien für optimal und nicht toxisch befunden worden (39, 41, 57, 72, 83, 112, 113). Doch starben auch in diesen Studien vereinzelt Ara-A-Kontrolltiere, auch bei vergleichsweise niedriger Dosierung, wenngleich dabei auch keine klinischen Auffälligkeiten beobachtet werden konnten. Auch in unserer Studie starben von

63 Ara-A-Medikamentenkontrolltieren drei Tiere, wofür wir keine Erklärung haben.

Aufmerksamkeit scheinen in diesem Zusammenhang auch Hinweise zu verdienen, die sich auf eine mögliche toxische Einwirkung von Ara-A auf die Leber beziehen.

Auch in unserer Arbeit zeigten die nur mit Ara-A behandelten Mäuse geringe Entzündungszeichen in den Leberschnitten, die sich klinisch allerdings noch nicht auswirkten.

In Studien über die Toxizität von Ara-A wurden jedoch bei höherer Dosierung von Ara-A deutlichere Leberschädigungen gefunden, wie z. B. stark vergrößerte Leberzellen, ein Befund, der der Vergiftung mit gewissen Alkaloiden ähnelte (64). Als Todesursache bei Maximaldosis von Ara-A wurde in diesen Studien aber eher ein Trauma oder eine Peritonitis vermutet (64).

Bei klinischen Behandlungsversuchen mit Ara-A gibt es jedoch nur wenige Hinweise auf eine speziell lebertoxische Wirkung von Ara-A. Bei zwei Patienten mit schwerer HSV-Infektion zeigte sich eine vorübergehende SGOT-Erhöhung (von 50 auf 100 Einheiten, und von 20 auf 65 Einheiten), ansonsten traten keine Auffälligkeiten bezüglich der alkalischen Phosphatase oder der LDH auf (21). Bei einer Behandlung von Neugeborenen-HSV-Infektion mit Ara-A fanden sich keine auffallenden Veränderungen der Leberparameter (23).

Bei Behandlungsversuchen von Zytomegalieviruserkrankungen verschiedenster klinischer Ausprägungen fanden Ch'ien und Mitarbeiter (19) ebenfalls keine Veränderungen der Leberwerte,

während in der Studie von Baublis und Mitarbeitern (6) eine vorübergehende Anhebung von SGOT und alkalischer Phosphatase auftrat.

Ara-A scheint also durchaus eine gewisse leberschädigende Wirkung zu besitzen, wenn es in höheren Dosierungen gegeben wird.

Es scheint nun naheliegend, daß diese potentielle Lebertoxizität von Ara-A in Gegenwart einer Zytomegalie-Infektion, die, wie oben gezeigt wurde (45, 83, 100, 121), ebenfalls eine besondere Affinität zur Leber hat, stärker zur Auswirkung kommt, bzw. daß sich die leberschädigenden Wirkungen von Ara-A und der Zytomegalievirusinfektion addieren oder potenzieren.

Dieser Mechanismus scheint uns auf Grund der vorliegenden Ergebnisse unserer Arbeit der wahrscheinlichste zu sein.

D Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Vidarabin (Ara-A) auf die Mäusezytomegalieinfektion der Maus in Bezug auf die Letalität und den Virusgehalt in der Leber untersucht, außerdem die Wirkung von Vidarabin auf die humorale Immunität der Maus beobachtet.

Dabei konnte keine negative Auswirkung von Vidarabin auf die humorale Immunität (hämolysierende Antikörper) der Maus festgestellt werden.

Die Behandlung der Maus, die mit subletalen Dosen von Mäusezytomegalievirus (Letalität kleiner als 10 %) infiziert wurde, mit Vidarabin führte zu einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinverhaltens und der Überlebenszeit, sowie zu einer deutlichen Zunahme der Letalität.

Der Virusgehalt in der Leber wurde durch Vidarabin bis zum 4. Tag nach Infektionsbeginn signifikant gesenkt, unterschied sich aber am 6. Tag nicht mehr von den unbehandelten Tieren und konnte auch nicht total ausgelöscht werden.

Trotz der anfänglichen Hemmung der Virusreplikation in der Leber durch Vidarabin war die Leber der mit Vidarabin behandelten Mäuse makro- und mikroskopisch deutlich pathologischer verändert als bei den unbehandelten Mäusen, was wir auf eine mögliche potentiell lebertoxische Wirkung von Vidarabin zurückführten, die nun in der Addition mit der Mäusezytomegalievirus-Infektion die auffallende Leberschädigung bewirkt haben dürfte und deshalb letztlich ein negatives Therapieergebnis erbrachte.

E S c h l u ß f o l g e r u n g

Die Behandlung der Mäusezytomegalievirus-Infektion der Maus mit Vidarabin in der von uns verwendeten Dosierung erscheint nicht sinnvoll. Es ist auch nicht zu erwarten, daß niedrigere Dosierungen oder andere Zeitpunkte der Medikamentengabe ein besseres Behandlungsergebnis bewirken (83).

Ob andere Applikationsarten, Stoffe, die besser löslich sind, wie zum Beispiel Adenosin Arabinosid-5'-Monophosphat (1, 55, 68), oder Blockierungen der Deamination von Ara-A zu Ara-Hx (94, 115) durch spezielle Inhibitoren ein besseres Therapieergebnis zur Folge hätten, bleibt weiteren experimentellen Studien vorbehalten.

Trotz der negativen Ergebnisse in den Tierversuchen sollte man mit einer Schlußfolgerung auf die Behandlung der menschlichen CMV-Erkrankungen vorsichtig sein, denn die Pathogenese der Infektion von Mäusen könnte durchaus von der menschlichen unterschieden sein. Auch gibt es Hinweise, daß der Metabolismus von Ara-A sich beim Menschen und bei der Maus unterschiedlich verhält (9, 36).

Die Beobachtungen, die bei Behandlungsversuchen von menschlichen CMV-Erkrankungen gemacht wurden (6, 19), sind vielleicht durchaus nicht so negativ zu werten. Eine größere toxische Wirkung konnte bei klinischen Behandlungsversuchen nicht festgestellt werden und in einigen Fällen, was im Zusammenhang mit dem Ergebnis unserer Arbeit vielleicht überraschen dürfte, normalisierte sich sogar eine Hepatosplenomegalie.

Die nach exzessiven Dosierungen von Ara-A beobachteten Leberschädigungen wurden bisher nur bei Mäusen und Ratten beobachtet.

Trotzdem dürfte insgesamt gesehen die Hoffnung auf eine erfolgreiche Behandlung menschlicher Zytomegalie-Erkrankungen mit Vidarabin mit etwas mehr Skepsis gesehen werden.

F L I T E R A T U R

- Nr. 1 Adams D. H., Cameron K. R.: Derivative of adenine arabinoside in experimental herpes encephalitis. *Lancet* 1977. 2: 760
- Nr. 2 Adler F. L.: Studies of Mouse Antibodies. I. The Response to Sheep Red Cells. *J. of Immunology* 1964. Vol 95. S. 25-38.
- Nr. 3 Alford C. A. Jr.: Summary of parenteral use of adenine arabinoside. In *Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent*. Edited by Pavan-Langston D., Buchanan R. A., and Alford C. A. Jr. Raven Press, New York 1975
- Nr. 4 Alford C. A. Jr., Whitley R. J.: Treatment of infections due to herpesvirus in humans: a critical review of the state of the art. *J. Infect. Dis.* 1967 Vol 133 Suppl. A 101-108.
- Nr. 5 Barton B. W., Tobin Jo'h.: Congenital cytomegalovirus infection treated with idoxuridine. *Br. Med. Journal* 1968. 4: 162-163.
- Nr. 6 Baublis Jo'h. V., Whitley R. J., Ch'ien L. T., and Alford C. A. Jr.: Treatment of cytomegalovirus infection in infants and adults. In *Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent*. Edited by Pavan-Langston D., Buchanan R. A., and Alford C. A. Jr. Raven Press, New York 1975
- Nr. 7 Benyesh-Melnick M., Probstmeyer R., Mc Combs R., et al.: Correlation between infectivity and physical virus particles in human cytomegalovirus. *J. Bacteriol.* 1966. 92: 1555-1561.
- Nr. 8 Bösel B., Hartung K. Hrsg. von : *Praktikum des Infektions- und Impfschutzes*. Berlin 1974. 1. Auflage.
- Nr. 9 Brink J. J., Le Page G. A.: Metabolism and distribution of 9- β -D-arabinofuranosyladenine in mouse tissues. *Cancer Res.* 1964. 24: 1042-1049.
- Nr. 10 Brodsky I., Rowe W. P.: Chronic subclinical infection with mouse salivary gland virus. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1958. Vol 99 S. 654.
- Nr. 11 Buthala D. A.: Cell culture studies on antiviral agents. I. Action of cytosine arabinoside and some comparisons with 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1964. 115: 69-77.

- Nr.12 Cameron I. R., Adams E. H.: Chemotherapy of herpes simplex virus encephalitis in mice by direct intracerebral injection. J.Infect.Dis. 1979. Vol 140:921-926.
- Nr.13 Campell J. B., Maes R. F., Wiktor T. J., Koprowski H.: The inhibition of rabies virus by arabinosylcytosin; Studies on the mechanism and specificity of action. Virology 1968. 34: 701-708.
- Nr.14 Cangir A., Sullivan A. P., Sutow W. W., et. als.: Cytomegalovirus-syndrome in children with acute leukemia: treatment with floxuridine. JAMA 1964. 201: 612-615.
- Nr.15 Cannon N. J., Ch'ien L. T., Dismukes W. E., Buchanan R. A., and Alford C. A.: The effect of adenine arabinoside(Ara-A) on cytomegalovirus (CMV) infection. Clinical research 1973. 21: 594.
- Nr.16 Carlström G., Alken J., Belfrage S., Hedenström G., Holmber L., Nordbring F., and Sterner G.: Acquired cytomegalovirus infection. Brit.med.J. 1968. 2: 521.
- Nr.17 Carter A. R.: Cytomegalovirus presenting as hepatitis. Br. Med. Journal 1968. 3: 786.
- Nr.18 Ch'ien L. T., Glasko A. J., Buchanan R. A., Alford C. A.: Human metabolic disposition of 9- β -D-arabinofuranosyladenine. Proceedings of eleventh interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy. Atlantic City, N.J., October 19-22. 1971. p. 47.
- Nr.19 Ch'ien L. T., Cannon N. F., Whitley R. J., Diethelm A. G., Dismukes W. E., Scott C. W., Buchanan R. A., Alford C. A. Jr.: Effect of adenine arabinoside on cytomegalovirus infections. Journal of infectious diseases 1974. 130: 32-39.
- Nr.20 Ch'ien L. T., Schabel F. M., Alford C. A. Jr.: Arabinosyl nucleosides and nucleotides. In Carter W. A. (ed.). Selectiv inhibitors of viral function. CRC Press. P227-257, Cleveland, 1973.
- Nr.21 Ch'ien L. T., Whitley R. J., Alford C. A. Jr.: Effect of adenine arabinoside on severe Herpesvirus hominis infections in man. J.Inf.Dis. 1973 Vol 128.Nr.5.
- Nr.22 Ch'ien L. T., Whitley R. J., Alford C. A. Jr., Galasso G. J., and the collaborative Study group: Adenine arabinoside for therapy of herpes zoster in immunosuppressed patients: preliminary results of a collaborative study. J. Inf. Dis. Vol 133, Supplement, June 1976.

- Nr.23 Ch'ien L. T., Whitley R. J., Nahamias A. J., Lewin E. B., Linnemann C. C., Frenkel L. D., Bellanti J. A., Buchanan R. A., Alford C. A. Jr.: Antiviral chemotherapy and neonatal herpes simplex virus infection: A pilot study-experience with adenine arabinoside (Ara-A). *Pediatrics* 1975. Vol 55, Nr. 5.
- Nr.24 Ch'ien L. T., Whitley R. J., Charamella L. J., Buchanan R. A., Cannon N. J., Dismukes W. E., and Alford C. A. Jr.: Clinical and virologic studies with systemic administration of adenine arabinoside in severe, progressive mucocutaneous herpes simplex virus infections. In *Adenine Arabinoside: An antiviral agent*. Edit. by Pavan-Langston D., Buchanan R. A., and Alford C. A. Jr. Raven Press, New York 1975.
- Nr.25 Cho C. T., Feng K. K., and Brahmacharya N.: Synergistic antiviral effects of adenine arabinoside on humoral antibodies in experimental encephalitis due to Herpesvirus hominis. *J. Inf. Dis.* 1976. Vol. 133: 157-67.
- Nr.26 Cho C. T., Feng K. K.: Interaction of adenine arabinoside and host defense factors in experimental infections due to herpesvirus hominis. *J. Infect. Dis.* 1977. Vol 135: 168-72.
- Nr.27 Conchie A. F., Barton B. W., Tobin J. O.: Congenital cytomegalovirus infection treated with idoxuridine. *Br. Med. J.* 1968. 4: 162-63.
- Nr.28 De Ruben A.: Inhibitory effect of some nucleosides on the growth of various human viruses in tissue cultures. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 1969. p578-584.
- Nr.29 Dixon G. J., Sidwell R. W., Miller F. A., and Sloan B. J.: Antiviral activity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine: V. Activity against intracerebral vaccinia virus infections in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1969. p.172-179.
- Nr.30 Eggers H. J.: Antivirale Chemotherapie. M-Kurse ärztliche Fortbildung Nr. 8. 1971. S. 289-291.
- Nr.31 Falke D.: Infektionen durch Viren der Herpesgruppe. In *Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger*. Hrsg. von Grumbach A., Kikuth W. Band II. Stuttgart 1969. S. 1348-1351.
- Nr.32 Feigin R. D., Schackelford P. G., De Vivo D. C., and Haymond M. W.: Floxuridine treatment of congenital cytomegalic inclusions disease. *Pediatrics* 1971. Nr.71.

- Nr.33 Fiala M., Chow A. W., Miyasaki K., and Guze L. B.: Susceptibility of herpesviruses to three nucleoside analogues and their combination and enhancement of the antiviral effect at acid pH. *J.Infect.Dis.* 1974. Vol. 129, No 1.
- Nr.34 Garabedian G. A., Scott L. V.: Plaque assay for herpes simplex virus in L-929(Earle) mouse fibroblasts. *Proc.soc.exp.Biol. (N.Y.)* 1967. 126: 568.
- Nr.35 Glasgow L. A., Hanshaw J. B., Merigan T. C., and Petralle J. K.: Interferon and cytomegalovirus in vivo and in vitro. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.* 1967. 125:843-849.
- Nr.36 Glazko A. J., Chang T., Drach J. C., Mourer D. R., Borondy P. E., Schneider H., Croskey L., and Maschewski E.: Species differences in the metabolic disposition of adenine arabinoside. In Pavan-Langston D., Buchanan A., and Alford C. A. Jr. Raven Press New York 1975.
- Nr.37 Gottlieb J. A., Bodey G. P.: Possible bone-marrow-depression by ara-A therapy for disseminated herpes zoster. *N.Engl.J.Med.* 1974. Vol 290: 914.
- Nr.38 Grant J. A., Sabin L. R.: Inhibition of vesicular stomatitis virus replication by 9- β -D-arabinofuranosyladenine. *Antiviral agents and chemotherapy*.1972. Bd 2:201-205.
- Nr 39 Griffith J. F., Fitzwilliam J. F., Casagrande S., and Butler S. R.: Experimental herpes simplex virus encephalitis: Comparative effects of treatment with cytosine arabinoside and adenine arabinoside. *J. Infect.Dis.* 1975 Vol 132, No 5.
- Nr.40 Fanshaw J. B., Betts R. F., Simon G., and al: Acquired cytomegalovirus infection: association with hepatomegaly and abnormal liverfunction test. *N.Engl.J. Med.* 1965. 272: 602-609.
- Nr.41 Harmon M. W., and Janis B.: Effects of cytosine arabinoside, adenine arabinoside, and 6-azauridine on rabies virus in vitro and in vivo. *J. Infect.Dis.* 1976. Vol 133 No.1.
- Nr.42 Harris S. R. B., and Boyd M. R.: The activity of iodo-deoxyuridine, adenine arabinoside, cytosine arabinoside, ribavirin and phosphonoacetic acid against herpes virus in the hairless mouse mode. *J.Antimicrob. Chemotherapy* 1977,3(Suppl A) 91-98.

- Nr.43 Faskell T. H.: Relationship of structure and antiviral activity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine analogs. Ann.NY Acad.Sci. 1977. 284: 81-90.
- Nr.44 Heni N., Heissmeyer H. und Schmitz H.: Klinik und Diagnostik der Zytomegalie-Hepatitis. Deutsche Med. Wochenschrift 1976. Nr. 44, S. 1610-1612.
- Nr.45 Henson D., Smith R. D., Gehrke J.: Non fatal mouse cytomegalovirus hepatitis. AmJ.Path. 1966. 49:871-880.
- Nr.46 Henson D., and Pinkerton H.: Characteristics of a plaque method for the murine salivary gland virus. Proc. Soc.Exp.Biol.Med. 1963. 117: 517-520.
- Nr.47 Henson D., Smith R. D., Gehrke J., Niapolitan C.: Effect of cortisone on nonfatal mouse cytomegalovirusinfection. A.J.Path. 1967. 51: 1001-1011.
- Nr.48 Hirsch M.S., Swartz M. N.: Antiviral agents. In Koch-Weser J. Ed.Drug therapy. N.Engl.J.Med. 1980. Vol 302: 903-907.
- Nr.49 Howard R. J., and Najarian J. S.: Cytomegalovirus-induced immune suppression. I. Humoral immunity. Clin.Exp. Immunol. 1974. 18: 109-118.
- Nr.50 Howard R. J., and Najarian J. S.: Cytomegalovirus-induced immune suppression II. Cell-mediates immunity. Clin. Exp.Immunol. 1974. 18: 119-126.
- Nr.51 Hubert-Habart M., and Cohen S. S.: The toxicity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine to purine-requiring Escherichia coli. Bioch.Biophys.Acta 1962. 59: 468-471.
- Nr.52 Kaufmann H.: 14. Interscience Conference on Antimicrobial Agents: Medical Tribune 1975. Nr. 11 S. 39.
- Nr.53 Kelsey E. K., Kern E. R., Overall J. Jr., and Glasgow L. A.: Effect of cytosine arabinoside and 5-iodo-2'-deoxyuridine on a cytomegalovirus infection in newborn mice. Antimicrob.Agents Chemoth. 1976. Mar. p 458-464.
- Nr.54 Kern E. R., Overall J. C. Jr., and Glasgow L.A.: Herpesvirus hominis infection in newborn mice: comparison of the therapeutic efficacy of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and 9- β -D-arabinofuranosyladenine. Antimicrob.Agents Chemother. 1975. 7: 587-597.
- Nr.55 Kern E. R., Richards J. T., Overall J.C. Jr.: Genital herpesvirus hominis infection in mice. II. Treatment with phosphonoacetic acid, adenine arabinoside, and adenine arabinoside-5'-monophosphate. U.Infect.Dis 1977 Vol.135:557-567.

- Nr.56 Kinkel A. W., and Buchanan R. A.: Human Pharmacology. I n Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent, Edit. by Pavan-Langston D., Buchanan R. A., and Alford C. A. Jr. Raven Press, New York 1975
- Nr.57 Klein R. J., Friedman-Kien A. E., and Brady E.: Treatment of poxvirus infections in rabbits with 9- β -D-Arabinofuranosyladenine. Antimicrob. Agents Chemother. 1974 Apr.,p. 409-412.
- Nr.58 Koplan P., et.al.: Treatment of Variola mayor with adenine arabinoside. J.Infect.Dis. 1975. Vol. 131. No.1
- Nr.59 Koplan J. P.: Inefficacy of adenine arabinoside in the therapy of smallpox. I n Adenine Arabinoside: an Antiviral Agent, Edit. by Pavan-Langston C., Buchanan R. A., Alford C. A. Jr. Raven Press, New York 1975.
- Nr.60 Kraemer K. G., Neiman P. E., Reeves W. C., Thomas ED.: Prophylactic adenine arabinoside following marrow transplantation. Transplant Proc. 1978. 10: 237-240.
- Nr.61 Kraybill E. N., Sever J. L., Avery G. B., Morassaghi N.: Experimental use of cytosine arabinoside in congenital cytomegalovirus infection. J. Pediatrics. 1972 80: 485-487.
- Nr.62 Krech U.: Der Stand der Chemotherapie bei Viruskrankheiten. M-Kurse ärztlicher Fortbildung 24 Nr. 1. S.4-7. 1974
- Nr.63 Kurtz S. M., Fiskin R. A., Kaump D. H., and Schardein J. L.: Toxicity of 9- β -D-Arabinofuranosyladenine in mice and rabbits. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1968.
- Nr.64 Kurtz S. M.: Toxicology of Adenine Arabinoside. I n Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent. Edit. By Pavan-Langston D., Buchanan R. A., and Alford C. A. Jr. Raven Press, New York 1975.
- Nr.65 Lang D. J. and Noren N.: Cytomegaloviremia following congenital infection. J.Ped. 1968. 73: 812
- Nr.66 Lauter C. B., Bailey E. J., Wilson F. M., and Lerner A. M.: Clinical and pharmacologic studies of Adenine Arabinoside in serious herpes-virus-infections. J. of Clinical investigation. 1973. 52,4-6:50a
- Nr.67 Lauter B., Bailey E.J., Lerner A.M.: Microbiologic assays and neurological toxicity during use of adenine arabinoside in humans. J.infect.Dis. 1976. 124:75-79.

- Nr.68 Le Page G. A., Naik S. R., Katakhar S. B., and Khaliq A.: 9- β -D-arabinofuranosyladenine 5'-phosphate metabolism and excretion in humans. *Cancer Research* 1975. 35: 3036-3060.
- Nr.69 Lerner R. S., Bailey E. J.: Synergy of Adenine arabinoside and Human Interferon against Herpes simplex Virus Typ 1. *J.Infect.Dis.* 1974.-Vol 130: No. 5.
- Nr.70 Levin R. S., Warner N. E., Johnson C. F.: Cytomegalic inclusions diseases in the gastrointestinal tract of adults. *Ann.Surg.* 1964. 159: 37-48.
- Nr.71 Luby J. P., Johnson M.T., Buchanan R. A., Ch'ien L. T., Whitley R., and Alford C. A. Jr.: Adenine Arabinoside therapy of varicella-zoster-virus-infections. Summary of phase II studies. In: Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent. Edit. by Pavan-Langston D., Buchanan R. A., and Alford C. A. Jr. Raven Press, New York 1975.
- Nr.72 Luby J. P., Johnson M. T., and Jones S. R.: Antiviral Chemotherapy. *Ann.Rev.Med.* 25,251-266. 1974
- Nr.73 Mantel N.: Evaluation of survival data and to new rank order statistics arising in its confederation. *Cancer, Chemotherapy reports* Vol 50,No.3 March 1966.
- Nr.74 Mc Cracken G. H., Luby J. P.: Cytosine arabinoside in the treatment of congenital cytomegalie. *J.Pediatrics* 1972. 80: 488-493.
- Nr.75 Medearis D. N. Jr.: Mouse cytomegalovirus infection. *Am.J.Hyg.* 1964. 80: 103-112.
- Nr.76 Mietaschk A.: Infektion der weißen Ratte mit humanem- und Mäuse-Zytomegalie-Virus unter einer immunsuppressiven Therapie. Dissertation. Fürstenfeldbruck 1973.
- Nr.77 Miller R. A., Dixon G. J., Ehrlich J., Sloan B. J., and Mc Lean I. W. Jr.: Antiviral Activity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine. I.-Cell Culture Studies. *Antimicrobial Agents Chemoth.* 1968 p.136-147.
- Nr.78 Müller W. E. G., Zahn R. K., Bittlingmaier K., Falke D.: Inhibition of herpesvirus DNA synthesis by 9- β -D-arabinofuranosyladenine in cellular and cell-free-systems. *Ann NY Acad Sci* 1977. 284: 34-38.
- Nr.79 Müller W. E. G.: Mechanisms of action and pharmacology: chemical agents. In: Galasso G. J., Merigan T. C., Buchanan R. A., eds. *Antiviral agents and viral diseases of man.* Raven Press 1979. S. 77-149.

- Nr.80 Nicols W. W.: In vitro chromosome breakage induced by arabinosyladenine in human leukocytes. *Cancer Res.* 24: 1502-1505. 1964.
- Nr.81 Oehme J.: Cytomegalie, im Handbuch der Kinderheilkunde. hrsg. von H. Opitz und F. Schmil. Berlin, Göttingen, Heidelberg. Band V: 282-286. 1963.
- Nr.82 Osborn J. E., and Walker D. L.: Virulence and attenuation of murine cytomegalovirus. *Infection and Immunity.* 1970, Feb. p. 228 - 236.
- Nr.83 Overall J. C. Jr., Kern E. R., and Glasgow L. A.: Effective Antiviral Chemotherapy in Cytomegalovirus infection of Mice. *J.Infect.Dis.* 1976. Vol 133 Suppl.: p A237-A244.
- Nr.84 Overall J. C. Jr., Kern E. R. and Glasgow L. A.: Treatment of herpesvirus hominis Typ II infections in mice with adenine arabinoside. In *Adenine arabinoside: An Antiviral Agent.* Edit. by Pavan-Langston D., Buchanan R. A., and Alford C. A. Jr. Raven Press. New York 1975.
- Nr.85 Pavan-Langston C., Dohlmann C. H.: A double blind clinical study of adenine arabinoside therapy of viral keratoconjunctivitis. *Am.J.Ophtalmol.* 1972. 74: 81-88.
- Nr.86 Pavan-Langston C., Buchanan R. A., Alford C. A. Jr.Edit. of *Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent.* Raven Press, New York, 1975.
- Nr.87 Peller F., Goetz O., Rath M.: Zytomegalievirus - Infektion der Maus unter Cytosin-Arabinosidbehandlung. *Infektion* 4 Nr. 3, S. 130-133. 1976.
- Nr.88 Peller P., Goetz O.: Immunsuppression und Cytomegalievirusinfektion - Tierexperimentelle Untersuchungen mit Cyclophosphamid. *Res.exp.Med.* 162, 267-280. 1974.
- Nr.89 Pelling J., Drach J. C., Shipman C.: Internucleotide incorporation of (³H) arabinosyladenine into herpes simplex virus Type I and KB cell DNA. Presented at the 79th annual meeting, American Society of Microbiologists. 1979. 4.abstract.
- Nr.90 Person D. A., Sheridan P. J., Herrmann E. C. Jr.: Sensitivity of types 1 and 2 herpes simplex virus to 5-iodo-2'-deoxyuridine and 9-β-D-arabinofuranosyladenine. *Inf.Immun.* 1970. 2: 815-820.
- Nr.91 Plotkin S.A., Stetler H.: Treatment of congenital cytomegalic inclusion disease with antiviral agents. *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 1970. 372-379.

- Nr. 92 Plotkin S. A.: Die "versteckte" Epidemie: Zytomegalie.
I n Tempo Medical Nr. 13, Juli 1978.
- Nr. 93 Plummer G., Lewis B.: Thermoinactivation of herpes simplex and cytomegalovirus. J.Bacteriol. 1965. 89: 671-674.
- Nr. 94 Plunkett W.: Increased toxicity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine in the presence of an inhibitor of adenosine deaminase. Ann, NY Acad. of Sci. 1977. 284: 91-102.
- Nr. 95 Pötsch F.: Virostatische Chemotherapie: I n Pharmakologie und Pharmakotherapie. Ersg. von Kümmerle, Garret, Spitzig. München 1971. S. 805-807.
- Nr. 96 Pollard R. B., Smith J. L., Neal E. A. et al.: Effects of vidarabine on chronic hepatitis B virus infection. JAMA 1978. 239: 1648-1650.
- Nr. 97 Prusoff W. H., Goz B.: Potertial mechanisms of action of antiviral agents. Fed.Proc.32: 1679-1687. 1973.
- Nr. 98 Reigin R. C., Shackelford P. G., De Vivo D.C., and Haymond M. W.: Floxuridine treatment of congenital cytomegalic inclusion disease. Pediatrics 1971. 48: 318-323.
- Nr. 99 Ross A. H., Julia A., Balakrishnan C.: Toxicity of adenine arabinoside in humans. J.Infect.Dis. 1976. 133 A Suppl: 192-198.
- Nr.100 Ruebner B. H., Miyae K., Slusser R. J., Wedemeyer Ph., and Medearis D. N. Jr.: Mouse cytomegalovirus infection. An electron microscopic study on hepatic parenchymal cells. Am.J.Path. 1964. 44: 799-821.
- Nr.101 Sachs L.: Statistische Auswertungsmethoden. Dritte Auflage. Berlin 1971.
- Nr.102 Sachs L.: Statistische Methoden - Ein Sofortheifer. Berlin 1970.
- Nr.103 Schabel R. M. Jr.: The antiviral activity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine (ara-A). Chemotherapy 1968. 13: 321-338.
- Nr.104 Schmidt-Ruppin K. H.: Chemotherapy of cytomegalovirus infection. Chemotherapy 1971. 16: 138-143.
- Nr.105 Seifert G., Oehme J.: Cytomegalie: I n Infektionskrankheiten. Hrsg. von Gsell O., Mohr W. Band I: 1967. S. 732-748.

- Nr.106 Selgrade M. K., Osborn J. E.: Role of macrophages in resistance to murine cytomegalovirus. *Infect.Immun.* 1974. 10: 1383-1390.
- Nr.107 Shannon W. M.: Adenine Arabinoside: antiviral activity in vitro. In *Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent*. Edited by Pavar-Langston D., Buchanan R. A., and Alford Ch. A. Jr. Raven Press, New York, 1975.
- Nr.108 Sidwell R. W., Dixon G. J., Schabel F. M. Jr., and Kaump D. H.: Antiviral activity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine II: Activity against herpes simplex keratitis in hamsters. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1969. p. 148.
- Nr.109 Sidwell R. W., Arnett G., Brockman G. W.: Comparison of a anticytomegalovirus activity by a group of pyrimidine analogues. *Ann.N.Y.Acad.Sci* 1970. 173: 592.
- Nr.110 Sidwell u.A.: Effect of selected biologically active compounds on in vitro CMV infection. In : *Abstr. Papers 7th Intersci.Conf. Antimicrob.Agents Chemother.* 1967. Abstr. No.64. Chicago.
- Nr.111 Sidwell R. W., Arnett G., Dixon G. J., Schabel F. M. Jr.: Purine analogues as potential anticytomegalovirus agents. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1969. 121: 1223-1230.
- Nr.112 Sloan B. J., Miller F. A., Ehrlich J., Mc Lean I. W., and Machamer H. E.: Antiviral Activity of 9- β -D-arabinofuranosyladenine, IV. Activity against intracerebral herpes simplex virus infections in mice. *Antimicrobial agents Chemotherapy* 1968. 161-171.
- Nr.113 Sloan B. J., Miller F. A., Mc Lean I. W. Jr.: Treatment of herpes simplex virus typ 1 and 2- encephalitis in mice with Ara-A. *Antimicrobial agents Chemotherapy* 1973. Vol.3: 74-80
- Nr.114 Sloan B. J.: Adenine Arabinoside: Chemotherapy Studies in Animals. In : *Adenine Arabinoside: An Antiviral Agent*. Edited by Pavan-Langston D., Buchanan R. A., and Alford Ch. A., Jr. Raven Press. New York. 1975.
- Nr.115 Sloan B. J., Kieilty J. K., and Miller F. A.: Effect of a novel adenosine deaminase inhibitor (Co-vidarabine, Co-V) upon the antiviral activity in vitro and vivo of vidarabine (Vira-ATM) for DNA-replication. *Annals NY Acc.of Sci.* 1977. 284: 60-80.
- Nr.116 Steele R. W., Chapa I. A., Vincent M. M., Hensen S. A., Keeney R. E.: Effects of adenine arabinoside on cellular immune mechanisms in humans. *Antimicrob. agents Chemother.* 1975. 7: 203-207.

- Nr. 118 Vonka V., Benyesh-Melnick M.: Thermoinactivation of herpes simplex virus and cytomegalovirus. J.Bact. 1966. 91: 221-226.
- Nr. 119 Waquar M. A., Burgoyne L. A., and Atkinson M. R.: Deoxyribonucleic acid synthesis in mammalian nuclei. Incorporation of deoxyribonucleotides and chain-terminating nucleotide analogues. Biochem.J. 1971. 121: 803-809.
- Nr. 120 Weller Th. H.: The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. N.Engl.J.Med. 1971. 285: 203-214; 267-274.
- Nr. 121 Weller Th. H., and Hanshaw J. B.: Virologic and clinical observations on cytomegalic inclusion diseases. N.Engl.J.Med. 1962. 266: 1233-1244.
- Nr. 122 Wentworth B. B., Gloyd P. W. Jr.: Thermostability of cytomegalovirusstrains. Arch.Gesam.Virusforschung 25 255-262. 1968.
- Nr. 123 Wiesmann E.: Medizinische Mikrobiologie. 3. Auflage. Stuttgart 1974.
- Nr. 124 Whitley R. J., Ch'ien L. T., Dolin R., Galasso G. J., Alford Ch. A.Jr.: Adenine Arabinoside therapy of herpes zoster in the immuneseuppressed. N.Engl.J. Med. 1976. 294: 1193-1199.
- Nr. 125 Whitley R. J., Soong S. J., Dolin R., Galasso G. J., Ch'ien L. T., Alford Ch. A.: Adenine Arabinoside therapy of biopsy-proved Herpes Simplex Encephalitis. N.Engl.J.Med. 1977. Vol. 297. S. 289-94.

L e b e n s l a u f

Am 11. September 1946 wurde ich als Sohn des Schuhmachermeisters Karl Rist und seiner Ehefrau Maria Rist, geb. Baumann, in Isny/Allgäu geboren.

Ich besuchte das Altsprachliche Gymnasium in Internaten der Steyler Missionare (St. Johann/Württb. und St. Wendel/Saar) und machte im März 1966 in St. Wendel/Saar das Abitur.

Im Mai 1966 trat ich als Novize bei den Steyler Missionaren (SVD) in St. Augustin/Bonn mit dem Ziel des Missionspriesterberufes ein, und studierte an der Philosophisch-Theologischen Ordenshochschule St. Augustin/Bonn drei Semester Philosophie/Theologie.

Im Herbst 1968 zog ich nach München und studierte dort acht Semester Philosophie/Theologie an der Universität und machte 1971 das 1. Theologische Examen. Aus persönlichen Gründen konnte ich mein Berufsziel nicht aufrechterhalten und so begann ich im Wintersemester 1971/72 mit dem Studium der Medizin an der Universität München, wo ich nach 13 Semestern im Frühjahr 1978 das Staatsexamen absolvierte.

Seither war ich von August 1978 bis Oktober 1979 als Assistenzarzt auf der Chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Sonthofen, im November 1979 auf der Tumornachsorgeklinik Oberstaufen (Schloßbergklinik) und ab Dezember 1979 bis jetzt auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Immenstadt tätig.

